

PCTORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE
Bureau International

DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁶ : A61K 9/127, 48/00, C12N 15/88	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 98/02144 (43) Date de publication internationale: 22 janvier 1998 (22.01.98)
<p>(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR97/01304</p> <p>(22) Date de dépôt international: 15 juillet 1997 (15.07.97)</p> <p>(30) Données relatives à la priorité: 96/08844 16 juillet 1996 (16.07.96) FR</p> <p>(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): CAPSULIS [FR/FR]; 218-228, avenue du Haut-Lévêque, F-33600 Pessac (FR).</p> <p>(72) Inventeurs; et (73) Inventeurs/Déposants (US seulement): MAHY, Patrick [FR/FR]; Résidence Hameau de Noailles, Appartement 301, Rue Haut Carré, F-33400 Talence (FR). ROUX, Didier [FR/FR]; 6 bis, avenue Langevin, F-33700 Mérignac (FR). LAVERSANNE, René [FR/FR]; 62, avenue du Parc d'Espagne, F-33600 Pessac (FR). AMEDEE, Joëlle [FR/FR]; 10, rue des Anciennes Ecoles, F-33600 Pessac (FR). FREUND, Olivier [FR/FR]; Résidence Val d'Or, Appartement 107, 104, rue de la Médoquine, F-33400 Talence (FR).</p> <p>(74) Mandataires: GIRAUD, Françoise etc.; Cabinet Beau de Loménie, 158, rue de l'Université, F-75007 Paris (FR).</p>	<p>(81) Etats désignés: AU, CA, JP, MX, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale. Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.</i></p>	
<p>(54) Title: COMPOSITIONS CONTAINING AT LEAST ONE NUCLEIC ACID</p> <p>(54) Titre: COMPOSITIONS CONTENANT AU MOINS UN ACIDE NUCLEIQUE</p> <p>(57) Abstract</p> <p>The invention concerns a composition containing at least one nucleic acid a part of which at least is enclosed in multilamellar vesicles, characterised in that said vesicles consist of two layers comprising at least one surfactant, the said two layers being concentric and giving said vesicles an onion-like structure. The surfactants used are non-cationic surfactants. The invention concerns the use of such compositions in pharmaceuticals, particularly in gene therapy and in <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i> transfection.</p> <p>(57) Abrégé</p> <p>L'invention concerne une composition contenant au moins un acide nucléique dont au moins une partie se trouve inclus à l'intérieur de vésicules multilamellaires, caractérisée en ce que lesdites vésicules sont constituées de bicouches comprenant au moins un agent tensioactif, lesdites bicouches étant concentriques et conférant auxdites vésicules une structure en oignon. Les tensionactifs utilisés sont des tensioactifs non cationiques. L'invention concerne l'utilisation de telles compositions dans le domaine pharmaceutique, en particulier en thérapie génique et en transfection <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i>.</p>		

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号
特表2000-516916
(P2000-516916A)

(43) 公表日 平成12年12月19日 (2000. 12. 19)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マ-ド* (参考)
A 6 1 K 48/00		A 6 1 K 48/00	
9/127		9/127	
31/711		31/711	
38/22		39/00	G
38/46		39/395	S
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 33 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号 特願平10-505688
(86) (22) 出願日 平成9年7月15日 (1997. 7. 15)
(85) 翻訳文提出日 平成11年1月18日 (1999. 1. 18)
(86) 国際出願番号 PCT/FR 97/01304
(87) 国際公開番号 WO 98/02144
(87) 国際公開日 平成10年1月22日 (1998. 1. 22)
(31) 優先権主張番号 96/08844
(32) 優先日 平成8年7月16日 (1996. 7. 16)
(33) 優先権主張国 フランス (FR)
(81) 指定国 EP (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), AU, CA, JP, MX, US

(71) 出願人 カプシュリース
フランス国 33600 ベサック 218-228
アヴニュー デュ オー・レヴェーク
(72) 発明者 バトリック マイ
フランス国 33400 タランス アバルト
マン301, リュ オー カレ レジダンス
アモー ド ノアーユー
(72) 発明者 ディディエ ルー
フランス国 33700 メリニャック 6,
ビス アヴニュー ランジュヴァン
(74) 代理人 弁理士 安富 康男 (外2名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 少なくとも1つの核酸を含有する組成物

(57) 【要約】

本発明は、少なくとも1つの核酸を含有しその少なくとも一部分が多重ラメラ小胞に内包されている組成物であって、上記小胞は、少なくとも1つの界面活性剤からなる二重層より構成されるものであり、上記二重層は、同心円状であって、かつ、上記小胞に玉ねぎ様構造を付与するものである組成物に関する。用いる界面活性剤は、非カチオン性界面活性剤である。本発明は、特に、遺伝子治療並びに生体外及び生体内トランスフェクションに関する医薬品での上記組成物の使用に関する。

【特許請求の範囲】

1. 少なくとも1つの核酸を含有しその少なくとも一部分が多重ラメラ小胞の内部に含まれている組成物であって、前記小胞は、少なくとも1つの界面活性剤からなる二重層より構成されるものであり、前記二重層は、同心円状であって、かつ、前記小胞に玉ねぎ構造を付与するものであることを特徴とする組成物。
2. 小胞は、1 μ m未満、好ましくは0.1～1 μ mの範囲の大きさを有するものである請求項1記載の組成物。
3. 小胞の二重層を構成する界面活性剤は、非カチオン性界面活性剤である請求項1又は2記載の組成物。
4. 非カチオン性界面活性剤は：
 - －水素化された又は水素化されていないリン脂質、
 - －酸、又は、アルカリ金属塩、アルカリ土類金属塩若しくはアミン塩の形態を採る、飽和の又はモノー若しくはポリ不飽和の、直鎖状又は分枝状のC₆～C₁₈の脂肪酸、
 - －上記脂肪酸と
 - ・ショ糖の
 - ・ソルビタンの
 - ・マンニトールの
 - ・グリセロール又はポリグリセロールの
 - ・グリコールの
 - エトキシ化された又はエトキシ化されていないエステル、
 - －上記脂肪酸のモノー、ジー若しくはトリグリセリド又はグリセリドの混合物
 - －飽和の又はモノー若しくはポリ不飽和の、直鎖状又は分枝状のC₆～C₁₈の脂肪アルコール、
 - －上記脂肪アルコールと
 - ・ショ糖の
 - ・ソルビタンの
 - ・マンニトールの

・グリセロール又はポリグリセロールの

・グリコールの

エトキシ化された又はエトキシ化されていないエステル、

－水素化された又は水素化されていないポリエトキシ化植物油、

－ポリオキシエチレンとポリオキシプロピレンのブロックポリマー〔ポロキサマー (poloxamer)〕、

－ポリエチレングリコールヒドロキシステアレート、

－コレステロール又はシトステロール等のステロール骨格のアルコール

からなる群より選択されるものである請求項3記載の組成物。

5. 小胞の二重層は、少なくとも2つの界面活性剤からなるものであって、そのうちの1つは、1～6の範囲の親水性親油性比(HLB)を有し、その他は、3～15の範囲の親水性親油性比(HLB)を有する請求項1～4のいずれか1項に記載の組成物。

6. 核酸の10%以上、好ましくは40%以上が、多重ラメラ小胞の内部に含まれる請求項1～5のいずれか1項に記載の組成物。

7. 核酸の60～100%が、小胞に含まれる請求項1～6のいずれか1項に記載の組成物。

8. 核酸は、DNA又はDNA由来のヌクレオチド配列である請求項1～7のいずれか1項に記載の組成物。

9. 核酸は、特定の遺伝子又は前記遺伝子由来の配列、特に所定のタンパク質をコードする配列である請求項1～7のいずれか1項に記載の組成物。

10. 核酸は、RNA又はRNA由来のヌクレオチド配列である請求項1～7のいずれか1項に記載の組成物。

11. 核酸は、センスオリゴヌクレオチド及び／又はアンチセンスオリゴヌクレオチドである請求項1～7のいずれか1項に記載の組成物。

12. 小胞は、更に、核酸とともにカプセル封入されたカチオン性アジュバント、特にポリエチレンイミンを含有する請求項1～11のいずれか1項に記載の組成物。

13. DNA凝集剤、特に、ヒストン、組込み又は組換え酵素、トポイソメラーゼ又はヘリカーゼ等の、カプセル封入された核酸の複製を最適化するための酵素、からなる群より選択された少なくとも1つのカプセル封入された化合物を含有する請求項1～12のいずれか1項に記載の組成物。

14. 小胞は、生体内のターゲットに特異的に認識されることが可能な化合物の添加、特に、モノクローナル抗体又はFabフラグメントの添加によって、表面が修飾されたものである請求項1～13のいずれか1項に記載の組成物。

15. 核酸を配合したラメラ液晶相を製造し、剪断力を用いて前記液晶相を多重ラメラ小胞に再配列させることからなることを特徴とする、請求項1～14のいずれか1項に記載の組成物の製造方法。

16. 薬理学的に許容される媒体中の懸濁液の状態で、請求項1～14のいずれか1項に記載の小胞を含有する医薬用組成物。

17. カプセル封入された核酸は、完全遺伝子、特に、欠失又は欠損している遺伝子を補うことを目的とした遺伝子、である請求項16記載の医薬用組成物。

18. 核酸は、特定の遺伝子の過剰発現又は活性の低減を誘発することを目的としたオリゴヌクレオチドである請求項16記載の医薬用組成物。

19. 核酸は、抗原タンパク質をコードするDNAである、ワクチンとしての請求項16記載の医薬用組成物。

20. 特にガン学若しくはウイルス学の分野又は骨の欠陥の修復において、欠失若しくは欠損した細胞機能を修復し若しくは改善すること、又は、細胞に新しい機能を付与することを目的とした医薬用組成物の製造における、請求項1～14項のいずれか1項に記載の玉ねぎ構造の多重ラメラ小胞の使用。

21. 請求項1～14項のいずれか1項に記載の組成物で細胞系を処理することからなることを特徴とする、前記細胞系の生体外形質転換方法。

【発明の詳細な説明】

少なくとも1つの核酸を含有する組成物

本発明は、少なくとも1つの核酸を含有する新規の組成物、及び、生体医療の分野、特に遺伝子治療におけるその使用に関する。

80年代の終わりに至るまで、生体医療の分野、より詳細には遺伝子治療の観点からのリボソームの使用は、余り期待できるように思われていなかった。トランスフェクション（真核細胞による原核又は真核細胞の遺伝子の翻訳及び発現）、特に一時的なその結果は、比較的平凡なものであった。外因性ウイルスのエンベロープに依存した結果、多数の生体外細胞系を用いた遺伝子輸送が著しく増加することとなった。しかしながら、人間の治療や動物の治療におけるその使用は、それらが有する潜在的な医原性の危険という問題を提起することは確実である。ここ最近の10年間の終わりにかけて、カチオン性界面活性剤の使用がトランスフェクションの結果をかなり向上させることが明らかになった。これ以来、カチオン性ベクターの使用に関係したある種の問題にもかかわらず、数多くの製剤が提案されており、そのうちのいくつかは特許を付与され市販されている。

一般に、三種類の非ウイルス性ベクターが用いられている：

－カチオン性ポリマー、

－細胞の受容体と結合したカチオン性タンパク質から構成される生化学的ベクター、

－リボソームと関係するか又は関係しないカチオン性脂質。

これらのベクターは全てカチオン性化合物からなるものである。

このようなベクターの使用は、特に、下記の文献に記載されている。

J. P. Behrら、Proc. Nat. Ac. Scienc.、86巻、6982頁、1989年

M. Cotten及びWagner、Curr. Opin. Cell Biol.、4巻、705頁、1993年

J. Haensler及びF. C. Szoka、Bioconj. Chem.、4巻、372頁、1993年

C. P. Hodgson、Bio Technology、13巻、222頁

1995年

F. D. Ledley, Hum. Gene Ther., 6巻, 1129頁,

1995年

J. S. Remyら, Proc. Nat. Ac. Scienc., 92巻, 1744頁, 1995年

V. S. Trubetzkoyら, Biochem. Biophys. Acta, 1131巻, 311頁, 1992年

カチオン性ベクターの使用から2つの本質的な問題が生じる:

1-これらの界面活性剤は一般に細胞毒性を有するものであり、この毒性を低減するためにある特定の化合物を開発したとしても、この問題は完全に解決されるものではない、

2-これらのベクターはその電荷のために、タンパク質、例えば、血清中に存在するタンパク質や、細胞壁と非常に強く相互作用するので、その使用を生体内で試みることができない。従って、これらは注入箇所付近の細胞に速やかに付着し、その全身拡散を減少させる。

以上が、これらのベクターが、遺伝子輸送において、培養中の細胞という生体外で優先的に使用される理由である。

リボソームが、リン脂質化合物からなる1以上の二重層によって外部媒体から分け隔てられた水性の核からなるコロイド構造であることはよく知られている。化粧品又は薬理学におけるこれの利用は、1960年代に発見されて以来、これらのベクターの多数の使用を記載する数多くの特許の対象となっている。

利用の観点からは、単独の二重層からなるリボソーム、「多重層小胞 (Multilayered Vesicles)」に対応するMLVという略字で呼ばれることが多い、いくつかの二重層からなるリボソームが、非常に早くから、際立っている。多重層小胞は、大きさが余り制御されておらず、一般に、マイクロメートルよりもはるかに大きい。単ラメラ小胞のなかでは、「小さな単ラメラ小胞 (Small unilamellar vesicles)」に対応す

るSUVという略字で呼ばれることが多い、大きさが100～300nmを超えない小さな小胞が、「大きな単ラメラ小胞 (Large unilamellar vesicles)」に対応するLUVという略字で呼ばれることが多い、大きさが数十マイクロメートルに達することもある大きな小胞と区別されている。

その実際的な大きさの観点から、多重ラメラ小胞 (MLV) は医療分野ではわずかに利用されているにすぎない。実際、大きさがマイクロメートルよりも大きい粒子が血液の循環に入り込むことで生じる塞栓症の危険性のために、静脈注射でこれを使用することは不可能である。また、大きすぎるサイズのためにこの小胞は組織障壁を通過することができないので、これを筋肉注射又は皮下注射すると血液中に存在することになる。更には、完全に制御された方法でMLVを製造することの可能な、実際に効率的な方法が存在しない。ほとんどの利用は、生体治療での使用に必要な安全性及び均一性の基準を満たしたSUVに関して展開されている。

界面活性剤、通常は脂質界面活性剤に基づいた小胞への核酸のカプセル封入についても文献に既に記載されている。現在までに記載された全ての小胞は、脂質核を取り囲む界面活性剤のいくつかの層を有するという事実が共通している。このような小胞として、特に、特許US4394448号及びWO-95/16437号に記載されている。

薬剤のベクター化におけるリボソームの使用又は遺伝子治療におけるその使用で実用上の問題の1つは、効率的にカプセル封入された原料水溶液の割合がまれに30%を超えるだけであるという事実に起因する低収率という問題である。また、一般に次に行う方法は、その製造方法で用いた有機溶媒を蒸発させる工程が必要となる。更には、実験結果が非常に期待外れであることが明らかになった。

実際に、脂質小胞、又は、DNAを含むカチオン性複合体を細胞に導入するために一般的に受け入れられている方法は、エンドサイトーシスの機構を通過するものである。細胞質では、侵入を果たした物体は、侵入したいかなる遺伝性物質をも分解するDNase等の酵素を含有するエンドソームに取り込まれる。リ

ポソームは、水性の核を取り囲む脂質膜が数少ないために、エンドソームのヌクレアーゼ及びプロテアーゼの分解的作用に抵抗しうるほどの十分な保護を与えない。このため、細胞質に効率よく侵入したとしても、リボソームはDNAを低い割合で核酸に到達させることができるにすぎない。

従って、生体内での使用に適応しうる合成ベクターの開発は重要不可欠のことであり、また、人間及び／又は動物の遺伝子治療に応用することが可能な化合物のための有効なベクターが現在は存在しないことから、その開発はなおさら重要である。ウイルスのエンベロープのみが、人間又は動物への応用に適応しうるトランスフェクションにおいて有効性を発揮している。

リボソームタイプの小胞又は少層ラメラ小胞は、いずれも、水性の核を取り囲む1以上のラメラ相から構成されていなければならない。この種類の小胞以外では、「玉ねぎ」構造として知られる構造を有し、かつ、その中心から表面に至るまで、液状の媒体によって分け隔てられたラメラ層の連続から構成されるという点で、上述のものとは構造的に異なる多重ラメラ小胞も知られている。これらの小胞は、液晶ラメラ相の製造、及び、剪断力を使用することによるその転換からなる方法によって得ることができる。この方法は、特に、フランス特許FR-2689418号を基礎とする特許WO93/19735号、又は、ここで引例として先に述べたWO95/18601号に記載されている。

フランス特許FR-2689418号によれば、上記転換は、液晶層の均一的剪断工程において行うことができ、これによって、大きさが制御されたマイクロカプセルとして知られる小胞が得られる。しかしながら、液晶ラメラ相の組成を調整することで、特に、その組成に配合する界面活性剤の性質を調整することでこの液晶相の小胞への転換は、単純な機械的操作、特に構成成分の混合で達成することができる。

本発明者らが行った研究では、上述した技術を使用することによって、非カチオン性のものであって、DNAをカプセル封入し、保護し、細胞に輸送することが可能な小さいサイズの新規の多重ラメラベクターを開発することができ、これが高いカプセル封入効率をもって、極めて簡単に製造できることを見出した。

他の利点は、本発明の組成物の製造で用いる化合物が全て市販されているという点である。

本発明の組成物の製造を可能にした方法の他の利点は、多くの種類の界面活性剤を用いることが可能な点である。

他の利点によれば、本発明は、おそらくはその特異的な構造のために、外部からの攻撃、特に酵素の攻撃から核酸を保護することが可能な小胞を提供する。この点については実施例1で例示する。このことは、リボソームと比較して、また、おそらくはエンドソーム等に存在するDNAaseの作用からDNAを保護することができないためにトランスフェクションにおいて余り有効なものではない古典的な少層ラメラ小胞と比較して、明白な利点を構成する。本発明の技術力は、一部には、このようなヌクレアーゼからの核酸の保護に起因する。これ以外で本発明者らの現状の知識である程度の説明ができるものとして、多重ラメラ小胞の第一層がエンドソームにおける酵素作用で効率よく破壊されるが、エンドソームが破裂しても、十分な量のカプセル封入されたDNAが残留し、細胞質にこのDNAを放出させ、こうして核に到達することが可能になるものと思われる。また、本発明の小胞内における界面活性剤の高濃度は、放出された界面活性剤の、エンドソームの壁に対する作用によって、上記第一層が浸食される間に、エンドソームの不安定化を高めることにもなる。

その利点の他のものによれば、本発明は、必要であれば、その組成に、カチオン性の化合物を配合することができる。この化合物は、トランスフェクションにおけるその重要性が既に良く知られているものであり、本発明の組成物におけるこれ以外の成分が上記化合物のカチオン性を遮蔽することができるので、生体内の利用分野において使用することが可能である。従って、本発明は、更に、トランスフェクションにおけるその使用が知られているカチオン性化合物の有効性を向上させ、その毒性を低減する手段を提供するものである。実際、用いられるほとんどのカチオン性化合物が細胞毒性を有するが、この細胞毒性はこれらの化合物をカプセル封入することで低減することができ、このことは本発明の更なる利点を構成する。

他の利点は、以下の記載及び実施例から明らかになり、これらから、このタイプのベクターが上述した全ての課題を実質的に克服することができるものであり、また、生体内で用いることができる界面活性剤に基づいた小胞という形態の小胞を初めて提供できるものであることが分かるであろう。

本発明は、その本質的な特徴のひとつによれば、少なくとも1つの核酸を含有しその少なくとも一部分が多重ラメラ小胞の内部に含まれている組成物であって

上記小胞は、少なくとも1つの界面活性剤からなる二重層より構成されるものであり、上記二重層は、同心円状であって、かつ、上記小胞に玉ねぎ構造を付与するものである組成物に関する。

「玉ねぎ」構造とは、実質的に球形の小胞が、上述したように、この小胞の中心から表面に至るまで、同心状の二重層の連続から構成されるものである多重ラメラ構造を意味するものとして理解されるものであり、このことから、このような構造を表現するため、アナロジーとして、玉ねぎ構造という名称が用いられている。

このような構造は、少なくとも1つの界面活性剤からなる液晶ラメラ相に、少なくとも1つの核酸を配合し、次いで、このラメラ液晶相を小さな多重ラメラ小胞の密な層に転換させることによって好適に得られる。

すなわち、本発明の他の本質的な特徴によれば、本発明は、上述したような、少なくとも1つの核酸を含有する組成物の製造方法に関するものであり、この方法によれば、上記核酸を配合するラメラ液晶相を製造し、上記液晶相の多重ラメラ小胞への再配列が、剪断力を利用することにより行われる。

上記剪断力は均一的な剪断力であってもよく、これには、大きさが完全に均一な小胞が得られるという利点がある。しかしながら、単純な機械攪拌でも、本発明の多重ラメラ小胞を形成させるのに充分であることが分かるであろう。

また別の特徴によれば、本発明は、上記方法によって得ることができる製品に関する。

フランス特許FR-2689418号によれば、上記転換は、液晶層の剪断と

いう均一的な工程でなすことができ、これによって、大きさが制御された小胞又はマイクロカプセルを得ることができる。しかしながら、液晶ラメラ相の形成を調節することで、特に、その組成に配合する界面活性剤の性質を調節することで、この液晶相の小胞への転換は、単純な機械操作、特に、構成成分の混合で達成することができる。

その組成は、好ましくは、界面活性剤の混合物を含む。一般には、相異なる親水性親油性バランスを有する少なくとも2つの別種の界面活性剤が用いられ、このことによって、二重層の性質を連続的に規制することが可能になり、多重ラメ

ラ小胞の形成を支配する不安定性の出現を制御することが可能になる。

ある好適な態様によれば、本発明の組成物を構成する小胞は、1 μm 未満、好ましくは0.1 \sim 1 μm の範囲の大きさを持つ。

本発明の他の好適な態様によれば、小胞の二重層を構成する界面活性剤は、非カチオン性界面活性剤であり、このことは、既に記載したように、カチオン性化合物を利用する先行技術の組成物を上回る大きな利点を有する。

ある好適な態様によれば、本発明の組成物に含有される小胞の膜は、好ましくは、

- 水素化された又は水素化されていないリン脂質、
- 酸、又は、アルカリ金属塩、アルカリ土類金属塩若しくはアミン塩の形態を採る、飽和の又はモノー若しくはポリ不飽和の、直鎖状又は分枝状の $\text{C}_6 \sim \text{C}_{18}$ の脂肪酸、
- 上記脂肪酸と
 - ・ショ糖の
 - ・ソルビタンの
 - ・マンニトールの
 - ・グリセロール又はポリグリセロールの
 - ・グリコールの
- エトキシ化された又はエトキシ化されていないエステル、
- 上記脂肪酸のモノー、ジー若しくはトリグリセリド又はグリセリドの混合物

ー飽和の又はモノー若しくはポリ不飽和の、直鎖状又は分枝状の $C_6 \sim C_{18}$ の脂肪アルコール、

ー上記脂肪アルコールと

・ショ糖の

・ソルビタンの

・マンニトールの

・グリセロール又はポリグリセロールの

・グリコールの

エトキシ化された又はエトキシ化されていないエステル、

ー水素化された又は水素化されていないポリエトキシ化植物油、

ーポリオキシエチレンとポリオキシプロピレンのブロックポリマー〔ポロキサマー (poloxamer)〕、

ーポリエチレングリコールヒドロキシステアレート、

ーコレステロール又はシトステロール等のステロール骨格のアルコール

からなる群より選択された少なくとも1つの界面活性剤を含有する。

ある好適な態様によれば、小胞の二重層の組成に配合される界面活性剤は、非カチオン性界面活性剤から構成される。

選択された界面活性剤、特に上掲の界面活性剤は、投与形態に応じて医薬用使用のため、法律で許可された界面活性剤の分類から好適に選択される。

比較的異なる性質を有する2つの界面活性剤は、上述した界面活性剤、特に相異なる親水性親油性バランス (HLB) を有する界面活性剤から好適に選択することができる。第一の界面活性剤は、1～6の範囲の親水性親油性バランスを有することが好ましく、第二の界面活性剤は、3～15の範囲の親水性親油性バランスを有する。

上で述べたように、多重ラメラ小胞の大きさのより良い制御は、フランス特許2689418号に従って実行することで達成することができる。

液晶ラメラ相を多重ラメラ小胞に転換した後に得られた調製品を、特に水性溶媒で希釈することにより、小胞の水性懸濁液を得てもよい。

上述したように、現在まで知られている核酸ベクター、特にリボソームタイプのベクターの欠点の1つは、カプセル化率が30%を超えることがほとんどないという点である。本発明による小胞の製造で用いられる方法では、これ自身で、およそ100%にもなりうるカプセル化率を達成することが可能になる。しかしながら、このようなカプセル化率は、本発明の小胞の特殊な構造のために高い活性が得られることを考慮すれば、必ずしも必要でないことが分かる。

従って、本発明の組成物における核酸のカプセル化率は、少なくとも10%であることが好適であり、少なくとも40%であることが好ましいが、60～100%の範囲にあることもでき、このことは先行技術の方法と比較して更なる利点に値する。

少なくとも1つの核酸を含む小胞を含有する本発明の組成物は、特に細胞系を形質転換させるために、特に1以上の遺伝子の発現を不死化又は修飾させるために、生体外の利用分野で用いてもよい。

本発明は、核酸のベクター化を行う手段を提供するものであり、生体外と同様に、生体内でもこのベクター化を実施することが可能である。

これらの小胞は、また、遺伝子治療で用いることが可能な医薬用組成物の製造において用いることもできる。

本発明の小胞に含まれていてもよい核酸の例として、DNA又はDNA由来のヌクレオチド配列を挙げることができる。

上記小胞は、また、特定の遺伝子又はこの遺伝子由来の配列、より具体的には所定のタンパク質をコードする配列を含んでいてもよい。

本発明の組成物は、また、上記小胞に、RNA又はRNA由来のヌクレオチド配列を含んでいてもよい。

他の態様によれば、上記小胞にオリゴヌクレオチドも含まれていてよく、このオリゴヌクレオチドはセンス型のものであってよく、及び／又は、アンチセンス型のものであってよい。

本発明の小胞は、大きさが1 μ m未満であることが好ましく、0.1～1 μ mの範囲にあることがより好ましい。特許FR-2689418号又はWO/FR

93/19735号の方法によれば、この大きさは、液晶相に対して均一な剪断力をかけることによって制御し限定することができるであろう。

本発明の特に興味深い態様によれば、特に、核酸の活性条件を向上させること、又は、カプセル封入した化合物に補足的な機能を付与することを目的として、各種の化合物を上記核酸とともにカプセル封入することが可能である。

このような組成物は、核酸とともにカプセル封入したい化合物を液晶層に配合し、上述した方法によって製造することが可能である。

核酸とともに好適にカプセル封入することができる化合物としては、特に、核酸とある種の複合体を形成して、核酸鎖の「折りたたみ」を促進し、このことがヌクレアーゼの存在下におけるその安定性を高めるような「凝集剤」タイプの化合物を挙げることができる。

ヒストンはタンパク質であって、DNAを凝集するために自然な状態で核内に存在するものであり、凝集剤の好ましい例として挙げることができる。ヒストンは、完全にDNAと結合した状態にあるという特殊性を有しており、このことから、多数のゲノム反応で重要な役割を果たすことができる。少なくとも1つの核酸、特にDNAとともに好適にカプセル封入できるヒストンとしては、ヌクレオソームヒストンとして知られるヒストンであって、ヌクレオソームの中にDNAを折りたたむ役割を有するもの、より具体的にはヒストンH2A、H2B、H3及びH4、並びに、ヌクレオソームでのDNAの複製に直接的には関与しないがヌクレオソームの折りたたみには関与するヒストンH1を挙げることができる。DNA 1 μ gあたり全タンパク質で1 μ gという割合で用いられる、ヒストンH1、H2A、H2B、H3及びH4の混合物（仔牛の胸腺由来）の使用は、最大のカプセル封入率をもって、本発明の小胞にDNA 50 μ gを凝集することを可能にした。

本発明の他の態様によれば、各種の酵素、特に組込み酵素、組換え酵素、又は、トポイソメラーゼ若しくはヘリカーゼ等の、カプセル封入された核酸の複製を最適化するための酵素が、本発明の多重ラメラ小胞に、好適にカプセル封入される。

従って、本発明のある態様によれば、細胞に導入された遺伝子を宿主細胞において発現させることを可能にし、とりわけ、導入された遺伝子がもたらす機能を保持する宿主細胞系を与えるために、ゲノムの組み込みを可能にするという機能を有する組み込み酵素を、多重ラメラ小胞にカプセル封入することができる。現在までは、DNAベクターとしてレトロウイルスの使用のみが、宿主細胞へのウイルスゲノムの組み込みを経て、遺伝子の安定かつ効率的な輸送を可能にした。しかしながら、生体医療の分野においてレトロウイルスの使用に関連する全ての問題を無視することができるわけではない。従って、本発明の技術力は、DNAとともに、タンパク質、特に、上記組み込みを可能にする酵素（この酵素は「組み込み酵素」といわれる）をカプセル封入することができるという点である。従って、DNA、及び、その組み込みに必要なツールを、同一のベクターで運搬することができる。

従って、所定のヌクレオチド配列を部位特異的に導入し、更には除去すること

も可能な組み換え酵素の添加によって、上記ゲノム組み込みを促進することが可能である。インテグラーゼと呼ばれる組み換え酵素が、宿主細胞のDNAに対して組み換えを行えるDNAベクターに配合することのできるヌクレオチド配列を認識することから、この種の組み換えは「部位特異的組み換え」と呼ばれる。この組み換え酵素は特異的な部位に接近して、DNAを切断し結合させる反応を開始する。

他の酵素ツールを更にベクターに配合してもよい。DNAは、カプセル封入されたDNAの量を最適化するために本発明で用いることもできるタンパク質、ヒストンとDNAが強力に結びついているクロマチンとして、真核生体で複製される。折りたたまれたヌクレオソームの凝集された構造が、複製作用を持つ酵素等を停止させるであろう障壁として作用するのであれば、トポイソメラーゼやヘリカーゼ等の酵素と、凝集されたDNAとの組み合わせは、ヘリックスの巻きやそれを開くといった最終的な問題を解決することを可能にする。

上述したように、本発明の組成物の利点の1つは、カチオン性の化合物を全く含有しない核酸小胞を提供する点である。

しかしながら、本発明のある態様によれば、ある種のカチオン性アジュバントを含むことが可能である。本発明の多重ラメラ小胞の存在が、その細胞毒性を遮蔽するか又はその活性を増加させることを可能にするからである。ある種のカチオン性アジュバントの効果は、小胞を細胞壁に静電的に固定化できる点であるように考えられており、このことから、ベクターの有効性の向上が説明できる。更に、カチオン性化合物の一部をカプセル封入するという事実は、その細胞毒性の低下を可能にして、カプセル封入が、隣接細胞と接触しながら侵入するカチオン性化合物の割合を減少させることは明らかである。

このカプセル封入は、その有効性を増加させる相助作用のために、カチオン性化合物の使用濃度を減少させることもできる。

以上のことから、このような化合物の使用で先行技術において知られる欠点を防止することで、本発明の小胞にカチオン性アジュバントをカプセル封入することが可能になる。

また、本発明の特に興味深い態様によれば、核酸を含む小胞は、所望のターゲットにより良く認識されることを目的として、その表面が修飾されてもよいであろう。この態様によれば、一般にはタンパク質である化合物を小胞に付着させてもよく、これにより、生体中のある種のターゲットによって特異的に認識されることが可能になるので、一方ではトランスフェクションの選択性を、他方ではその有効性を高めることができる。いくつかの方法、特にモノクローナル抗体に依存して行うことができる。全てのケースで、認識効率が最大となるように、小胞の表面にターゲット系を固定化することが必要である。この固定化は、物理的方法（吸着）で又は化学的方法でも行うことができる。いずれのケースでも、本発明の小胞を入手して操作する際の容易さが、ベクターの表面にうまく機能を付け足すための主要な利点である。生体治療分野での重要な用途の1つは、表面にモノクローナル抗体又はFabフラグメントを有する小胞の使用である。これらは、例えば、ウイルス粒子（ヘルペスウイルス・・・）の認識に関与する、細胞表面の受容体に特異的なものであり、細胞応答の変換器として作用するものである。

本発明は、他の本質的な特徴によれば、薬理学的に許容される媒体中の懸濁液

の状態で、各種核酸を含有する上述した小胞を含有する医薬用組成物に関する。

本発明は、また、上記組成物を使用する治療的処置方法に関する。

所望の生物学的又は薬理学的な活性に応じて、各種の核酸をカプセル封入することができる。

従って、完全遺伝子のカプセル封入を、欠失している遺伝子又は欠損している遺伝子を与えることを目的とした医薬用組成物を提供するために実施することが可能である。例として、このような使用を膵臓線維症の治療でなすことが可能である。

特定の遺伝子の過剰発現又は活性の低減を誘発することを目的とした、オリゴヌクレオチド等の核構成成分のカプセル封入が、ガン学又はウイルス学の分野で用いることができる。

抗原タンパク質をコードするDNAから採取するワクチンのモデルに、上記ベクターを用いることもできる。

相補的ヌクレオチド配列のベクター化は、リボソームによるmRNAの読み取りを阻害し、活性タンパク質へのその翻訳を阻止するので、RNAをベクター化することもできる。

本発明は、また、細胞系を形質転換することを目的とした薬剤としての、上述した組成物の使用にも関する。

従って、本発明は、上述した組成物で細胞系を処理することからなる、上記細胞系の生体外形質転換方法に関する。

より具体的には、この場合、その適正な発現及び／若しくは1以上のタンパク質をコードする他の遺伝子の発現を修飾するため、又は、ウイルスの遺伝子及び／若しくはウイルスのがん遺伝子の組み込みによって細胞系を不死化するために、核内及び／又は染色体内に存在するように、細胞の核のレベルにまで、遺伝子が運び込まれる。

本発明の手法の更なる利点によれば、本発明は、血清の存在下でトランスフェクションを実施することが可能な小胞を提供するが、このことは、先行技術の小胞では実施不可能であった。このことは、界面活性剤に基づく小胞の、生体内に

おける使用を試みることを初めて可能にしたという長足の進歩を構成する。

この点は、細胞系、及び、分化したヒト細胞の初代培養に対する生体外トランスフェクション実験で証明された。現時点で公知の他の人工的なベクター（カチオン性脂質）が同じ培地で作用しない場合に、ウシ胎児血清の存在下でウシ胎児血清が存在しない場合と同程度に良好な、トランスフェクションの結果を得ることができた。後者の結果は生体内の使用に必要な不可欠な条件であるので、基本的なことである。

最初の生体内トランスフェクションの結果は極めて有望なものである。この結果は、遺伝子の移動が腫瘍点及び全身注入で生起しうることを示した。 β -ガラクトシダーゼをカプセル封入した本発明の小胞の、動物への静脈注射によって、種々の器官（心臓、肺及び肝臓）で、ガラクトシダーゼ活性を誘導することができる。この点は、本方法の治療目的での使用に関して極めて有望な点である。

従って、本発明は、また、特にガン学若しくはウイルス学の分野又は骨の欠損の修復において、欠失若しくは欠損した細胞機能を修復し若しくは改善すること、又は、細胞に新しい機能を付与することを目的とした医薬用組成物の製造における、玉ねぎ構造の多重ラメラ小胞の使用にも関する。

すなわち、上記ベクターの使用は、いくつかの生体医療の研究分野、特にガン学に関連する。この分野では、最初の結果が、腫瘍を持つマウスで得られた。リポーター遺伝子をカプセル封入した小胞の注入を行った後、腫瘍において遺伝子活性が確認された。従って、腫瘍の後退に対して遺伝子の上記移動が与える影響を研究するために、細胞分裂阻止因子をコードする遺伝子か、又は、アポトーシス（細胞死）に関与する遺伝子を持っているようなベクターの使用を試みる事が可能になる。

更には、上記ベクターの他の利点は、所定の注入部位において生体内でも作用することである。上記ベクターの他の利用分野は、骨移植という活発な方法に関する。「骨形態形成タンパク質（Bone Morphogenetic Proteins）」に相当する略号「BMP」で知られる骨誘導タンパク質をコードする遺伝子を有する小胞を骨損傷において注入すれば、骨形成を促進するであ

ろう。整形外科分野でのこれら骨誘導因子の未来が非常に期待できるものであっても、現時点では、全身に何ら影響を及ぼさずに、注入部位での輸送システムを制限する、ベクター化という大きな問題が依然として解決されずに残っている。本発明は、初めて、許容可能なベクターを提供する。更に、 β -ガラクトシダーゼ遺伝子を有する小胞の全身注入、及び、最初の生体内分散実験は、種々の器官における遺伝子活性を示した。上述したように、ターゲティングとともに、このような方法の使用は、治療分野で明るい前途を開くものである。

以下に掲げる実施例は図1～3に関して示すものである。

－図1：実施例1で調製した多重ラメラ小胞の、nmで表示した光線のヒストグラム。

－図2：実施例3に関して掲げたもので、本発明による2種類の相異なる調剤及び1つの市販ベクターに関して、ヒト皮膚の繊維芽細胞に対する β -ガラクトシダーゼ遺伝子のトランスフェクションの効率。

－図3：実施例4に関して掲げたもので、市販ベクターと比較して、カチオン性アジュバントを含むか又は含まない、本発明による微小小胞の各種調剤を用いた、ヒト繊維芽細胞に対する β -ガラクトシダーゼ遺伝子のトランスフェクションの効率に関する比較結果。

実施例

実施例で記載した量及び割合は、他に記載がなければ、重量を基準にしたものである。

実施例1

DNAseに対する保護

本実施例の目的は、DNAをカプセル封入し、これを酵素DNAseの作用から保護するために、本発明の多重ラメラ微小小胞の有効性を実証することである。このために、DIG化DNA (DNA-DIG) を本発明の方法に従ってカプセル封入した。次いで、DNAを含有するミクロ小胞を、遊離のDNAと同様に、酵素の作用に付する。次に、相補的DNAのハイブリッド形成及び染色によってDNAが無傷なことを明らかにした。こうして、本方法に従ってカプセル封入

されたDNAは無傷であり、遊離のDNAは酵素に分解されたことが分かった。

a) サンプルの調製

DNA-DIGの $1\mu\text{g}/50\mu\text{g}$ 溶液 (Boehringer Mannheim) $10\mu\text{l}$ 、すなわちDNA-DIG 200ng を、水 $375\mu\text{l}$ 、エチレンオキサイド4分子を有するエトキシ化ラウリルアルコール (ラウレス4、例えば、Lauropal-4-Witco) 100mg 、及び、ホスファチジルコリン (Phospholipon P90, Natterman) 90%を有する大豆レシチン 525mg と混合した。あらかじめ水を $0.25\mu\text{m}$ フィルターでろ過して滅菌し、界面活性剤をUV光線で処理した。全てのサンプルに対して均一かつ均質な剪断力を与えるよう注意しつつ常温で混合した後、液晶層に相当するペーストであって、微小小胞というコンパクトな形態に配列したものが得られた。このペーストを24時間静置した。

使用に当たって、ペースト 50mmol g を滅菌水 1ml で希釈することで微小小胞の分散体を調製した。

b) 特性評価

ペーストの水中1%分散体に対する動的光散乱で微小小胞の大きさを測定した。約 $0.2\mu\text{m}$ という値の大きさが得られた。この値は電子顕微鏡 (定温破壊) で確認した。顕微鏡で測定された大きさの分布のヒストグラムを与える図1で、大きさの測定の結果を示した。大きさのより正確な調査は、特許WO-A-9319735号に記載の方法を用いて行うことができる。

c) 試験方法

DNA含有微小小胞の塩基性分散体は、水 1ml に分散させたペースト 50mg から調製した。次いで、この塩基性分散体を水で希釈して、10倍ごとの変化をつけて $10\text{ng/ml} \sim 1\text{pg/ml}$ のDNAを含有する5つの試験用分散体を得た。コントロール溶液として用いるために、同濃度の遊離DNA-DIG溶液を調製した。

これらの分散体を 37°C で1時間、DNA $1\mu\text{g}$ あたりDNAseが2単位という比率のDNAse Iの溶液 (Boehringer Mannheim)

と接触させて放置した。次の工程では、ニトロセルロース膜 (Hybond-C super) に固定し、次いで「ドットプロット」法を用いて相補的DNA-DIGとハイブリッドを形成させることにより、DNA-DIGが存在するか否かを明らかにした。次に、Boehringer Mannheimが開発した方法でGenius、Applications Manuel、Boehringer Mannheim Biochemicals Indianapolis 5～7、1989に記載の方法に従い、NBT/BCIPで染色してその膜を可視化した。

d) 結果

「ドットプロット」法で以下のことが分かった：

- ・DNAseで処理されていない遊離のDNAは、「ドットプロット」法で可視化された、
- ・DNAseで処理された遊離のDNAは、全濃度で、全体的に分解されていた、
- ・本発明の方法でカプセル封入され、DNAseで処理されていないDNAは、同法で可視化された、
- ・本発明の方法でカプセル封入され、DNAseで処理されたDNAは、明らかに可視化されたままであったので、酵素作用から保護された、そして
- ・(DNAを含まない) 空の微小小胞は、この分析で可視化反応を与えなかったもので、誤った陽性という危険性は除かれた。

「ドットプロット」イメージの比較強度のより詳細な分析から、DNAの約80%が酵素作用から保護されたことを評価することができた。分解された20%がカプセル封入されずに残存したDNAに相当するものと推定することができ、このことから、カプセル封入のレベルを約80%と評価することができる。これらの結果は、DNAの劣化を示さなかったアガロースゲル上での電気泳動実験で確認された。

実施例2

カプセル封入されたDNAと培養細胞との相互作用

この実施例の目的は、本発明の方法でカプセル封入されたDNAが、細胞内部に侵入し、そこから放出され、更には核に到達しうることを証明することである。この目的のために、プラスミドのDNAを蛍光プローブに結合させた。これによって、蛍光顕微鏡で細胞内への取込みを可視化することでできるであろう。

a) サンプルの調製

0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度のプラスミドDNA (pBR322、4363個の塩基対、Promega) をフルオレセイン (YoYo-1 プローブ、Molecular Probe 社) に結合させて、次に、実施例1と同様の方法で、
DNA YoYoの水溶液：37.5%
4モルのEOでエトキシ化されたエトキシ化ラウリルアルコール：10%
大豆レシチン (ホスファチジルコリン90%)：52.5%
を用いて、多重ラメラ微小小胞にカプセル封入した。

b) 細胞の培養：

37℃の5% CO₂ 雰囲気下で仔ウシ血清 (Gibco, Life technology) 10%、ペニシリン-ストレプトマイシン (Gibco, Life technology) 10000Uを含有する正統的培養条件下 (IMDM, Gibco, Life technology) において、各種の細胞系、ヒト繊維芽細胞 (初代培養)、NIH 3T3 (ATCC) を保持した。これらの細胞を、IMDM培地のみにおいて、DNA含有微小小胞の分散体10%の存在下で5分間放置した。この培養時間の後、細胞を洗浄して小胞分散体を除去し、次いで可視化した。

c) 結果

様々な培養継続時間の後、これらの細胞を蛍光顕微鏡で可視化した。

- ・ $t=0$ (コントロール、洗浄前) で、微小小胞が蛍光点として上澄み液で観察された。
- ・ $t=5$ 分で、蛍光微小小胞が細胞の接触面で可視化された。蛍光の細胞質内での拡散が始まった。
- ・ $t=1$ 時間で、蛍光の細胞質内での拡散が認められた。核の周囲がはっきりと

見えており、核での蛍光の開始が見られる。

・ $t = 2 \sim 8$ 時間の間で、蛍光が核内で見えだした。蛍光は細胞質内で強力なままである。

・ $t = 48$ 時間で、蛍光は弱まり、核の近辺に存続するのみである。

この実施例は、DNAが繊維芽細胞に取り込まれ、細胞質を通過して核に到達することができることを証明した。

実施例3

遺伝子のカプセル封入、並びに、この遺伝子の輸送及び一時的な発現の証明

この実施例の目的は、本発明の多重ラメラ微小小胞にカプセル封入された遺伝子が細胞の核に取り込まれて発現できることを証明することである。行われた実験は、 β -ガラクトシダーゼをコードする遺伝子を使用したものであり、その発

現は、トランスフェクションのなされた細胞の核がX-GAL試薬との反応で青く着色することによって確認した。この実施例では、トランスフェクションの効率を、市販のベクターであるLipofectAce（登録商標）（Life Technology）のものと比較した。

a) 微小小胞の調製

10mg/mlの遺伝子水溶液を用いて、実施例1の方法に従って、 β -ガラクトシダーゼ（LacZ）をコードする遺伝子を含有する微小小胞を調製した。

修飾LacZタイプの3種類の遺伝子：pRSCLacZ、pCHLacZ及びpRSVLacZ-Sal-Iをテストした。各遺伝子を、分子量が3.5kDa又は10kDaで濃度が100 μ Mのポリリシンとともにカプセル封入した。

微小小胞の比較は以下の通りである：

ホスファチジルコリン90%を含有する大豆レシチン・・・41.5%

コレステロール（Sigma）・・・3.5%

オレイン酸カリウム・・・5%

DNAとポリリシンの水溶液・・・49.5%

細胞を培養するにあたり、微小小胞を水に分散させて、DNA10 μ g/mlを含有する培養培地を得た。

b) トランスフェクション

細胞（ヒト繊維芽細胞、初代培養）を、実施例2と同様の正統的培養条件下で保持した。培養にあたって、培地を、クロロキン $100\mu\text{M}$ を含有し血清を含有しないIMDM培地と交換した。微小小胞とともに、2～12時間培養を行った。次いで、細胞を洗浄した後、完全な培地（IMDM、血清、ペニシリンーストレプトマイシン）で48時間培養した。

細胞を洗浄し、固定し、X-GAL試薬（Biosynth AG）を添加することにより、トランスフェクションの可視化を行った。この試薬は、 β -ガラクトシダーゼ遺伝子に対応する酵素によって分断されて、「核局在化シグナル」（nuclear localisation signal）という用語に従

って<nls>と一般に呼ばれる核内シグナルのために、もっぱら核内のものである濃紺の沈殿物を与える。

同濃度の遺伝子とともに、市販のベクターLipofectAce（登録商標）（Life Technology）を製造業者の方法に従って用いて、比較のために、同じ実験を行った。

c) 結果

結果は、トランスフェクションのなされた細胞の割合として、図2で示した。各ヒストグラムは、1つの遺伝子に対応する（左から右へ：pRSClacZ、pCHlacZ及びpRSVLacZ-Sal-1）。各々において、得られたトランスフェクションの割合は、左から右へ、LipofectAce（登録商標）、3.5kDaのポリリシンの入った微小小胞、及び、10kDaのポリリシンの入った微小小胞で得られたものである。

全ての場合で、市販のベクターよりも微小小胞を用いたほうが結果が良好であることが分かった。微小小胞の場合では、25～35%のトランスフェクション率が得られた。

「ドットプロット」法で ^{32}P 標識cDNAを用いて、このリポーター遺伝子に対して、実施例1に記載したものと同一DNase実験を行った。これで、実施例1と同じように、本発明に従って微小小胞にカプセル封入されたDNAはDN

As eに分解されないことが分かった。これに対して、観察されたカプセル封入率は低いものである。市販品でベクター化された同遺伝子に関して、DNA s eからの保護という同じ実験を行ったが、この種のベクターは保護を示さず、このことから、この市販品で得られたトランスフェクションが低いレベルにあることが分かるであろう。

実施例4

遺伝子のカプセル封入、並びに、この遺伝子の輸送及び一時的な発現の証明：

カチオン性アジュバントの効果

この実施例の目的は、トランスフェクションの効率を向上させるための、カチオンタイプのアジュバントの使用可能性を証明することである。使用するアジュバントは、ポリマー、ポリエチレンジイミンである。ポリリシンを用いないこと以外は、実施例3（ β -ガラクトシダーゼ遺伝子のトランスフェクション）の条件と類似した条件下でいくつかの実験を行った。比較として、ポリリシンを含むアジュバントを含まない2つの調剤を調製した。一つは実施例3（レシチン、オレイン酸カリウム、コレステロール）のものと同一のものであり、他方は実施例1（レシチン、ラウレス4）のものと同一のものである。最後に、コントロールとして、市販のベクターLipofect Ace（登録商標）（Life Technology）か、又は、ポリエチレンジイミンと複合化した、カプセル封入していないDNAのいずれかを使用して、3つのトランスフェクション実験を行った。

a) 微小小胞の調製

本方法は、遺伝子としてpRSVLacZを用いて、実施例3で用いられた方法と全く同一である。濃度が10mM又は100 μ Mである、カプセル封入以前のDNAの水溶液に、ポリエチレンジイミン（モル質量50kDa、Sigma）を添加した。

実施例3（レシチン、コレステロール、オレイン酸カリウム）又は実施例1（レシチン、ラウレス4）の方法に従って、ポリエチレンジイミンを含まないコントロールを調製した。

b) トランスフェクション

本方法は実施例3の方法と同じものである。ヒト繊維芽細胞（初代培養）でトランスフェクションを行った。全ての場合で、培養培地における遺伝子濃度は10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ である。

本発明による小胞の分散体の代わりに、DNA及びポリエチレンジアミンを含有する予め混合した溶液を、培養培地に導入して、カプセル封入していないDNAを用いた実験を行った。

c) 結果

結果は、トランスフェクションのなされた細胞の割合を示すヒストグラムとして表し、表3で示す。この結果は、左から右の順序で、以下の試験に対応する：

- 1－レシチン及びオレイン酸カリウムに基づく微小小胞
- 2－レシチン、及び、エチレンジアミン4モルを有するラウリルアルコール（ラウレス4）に基づく微小小胞
- 3－10mMの濃度でポリエチレンジアミンとともにカプセル封入した、レシチン及びオレイン酸カリウムに基づく微小小胞
- 4－100 μM の濃度でポリエチレンジアミンとともにカプセル封入した、レシチン及びオレイン酸カリウムに基づく微小小胞
- 5－ポリマー濃度が10mMであるポリエチレンジアミンと複合化したDNA
- 6－ポリマー濃度が100 μM であるポリエチレンジアミンと複合化したDNA
- 7－市販のベクターLipofectAce（登録商標）（Life Technology）の使用

ポリエチレンジアミンとともにカプセル封入したために、トランスフェクションのなされた細胞の割合が35%に達したことが分かる。カプセル封入されておらず、単にポリエチレンジアミンと複合化したDNAもトランスフェクションがなされるが、トランスフェクションの割合がそれほど良好ではない。アジュバントの有無に関わらず、オレイン酸カリウムに基づくベクターを用いて行った全試験は、市販のベクターよりも良好な結果を与えた。

実施例5

遺伝子のカプセル封入、並びに、この遺伝子の輸送及び一時的な発現の証明：非カチオン性アジュバントの効果

この実施例の目的は、トランスフェクションの効率を向上させるため、DNA凝集を行う非カチオン性アジュバントの共カプセル封入の可能性を証明することである。用いるアジュバントは、子牛の胸腺から採取した、ヒストンH1、H2 a、H2 b、H3、H4の混合物（提供者：Boehringer）である。用いるDNAは、実施例4で用いたものと同じである。

a) ヒストンによるDNAの凝集

等量のDNAと、子牛の胸腺から採取した、ヒストンH1、H2 a、H2 b、H3、H4の混合物とを同時に溶液（水12 μ lにDNA50 μ gとヒストン50 μ g）に投入し、混合物を10分間37℃で培養することにより、DNAを予め凝集した。

b) 微小小胞の調製

本方法は、遺伝子溶液の代わりに、DNA／ヒストン混合物の溶液を用いて、実施例3で用いられた方法と全く同じである。

小胞の重量による組成を以下に示す：

ホスファチジルコリン90%を有する大豆レシチン：	31.5%
コレステロール	6.5%
4EOを有するエトキシ化されたラウリルアルコール	2%
DNA／ヒストン混合物の水溶液	60%

c) カプセル封入率の測定

DNA1 μ gを（ランダムプライミングとして知られる方法に従って）³²Pで標識し、（DNAの量が50 μ gになるように）標識していないDNA49 μ gと混合した。このDNAをカプセル封入した後、小胞を水に分散した。この懸濁液を45分間30000 rpmで超遠心分離にかけた。上澄み液を固形物から分離し、存する放射能を評価するために、それぞれを β -カウンターで計測した。

測定したカプセル封入率は常に80%以上であった。

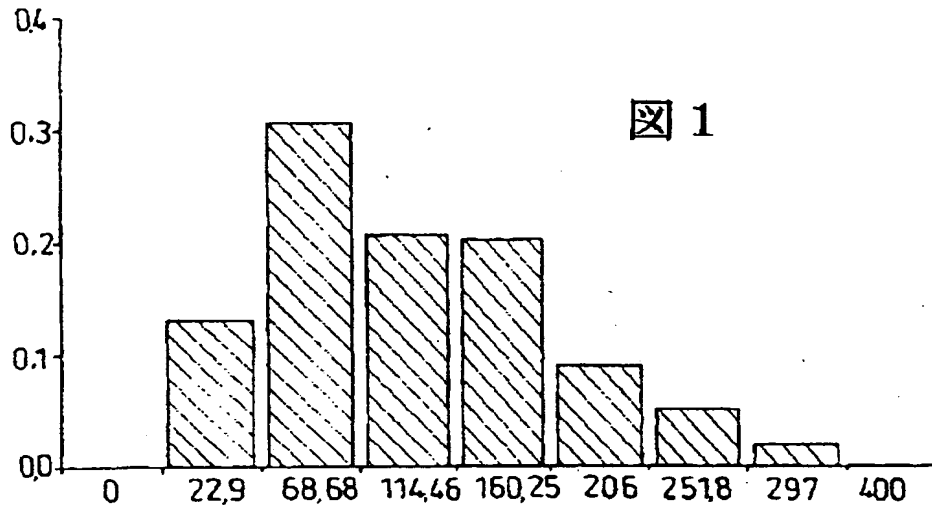
d) トランスフェクション

実施例3で記載したものと同一培養及び計測方法に従って、ヒト皮膚繊維芽細胞でトランスフェクション実験を行った。細胞と接触させて放置した分散体で用いられたDNAの濃度は $5\mu\text{g}/\text{ml}$ であった。

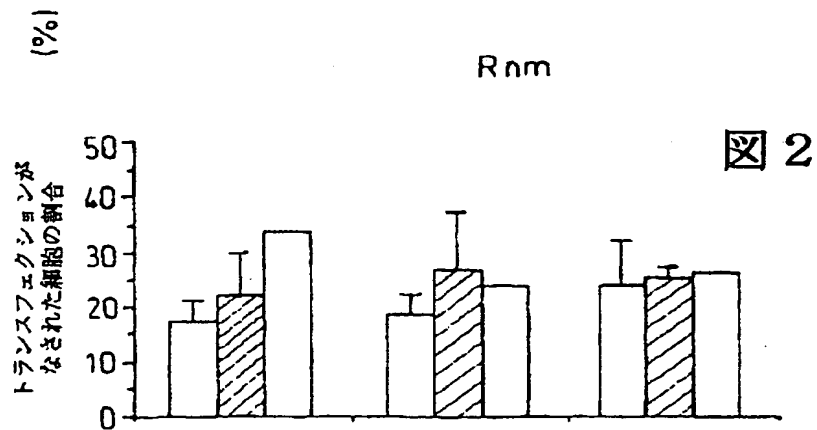
上記条件下でトランスフェクションの割合は、(培養された細胞に対して、トランスフェクションのなされた細胞の数で規定すると)20~30%の範囲内で

ある。

【図1】

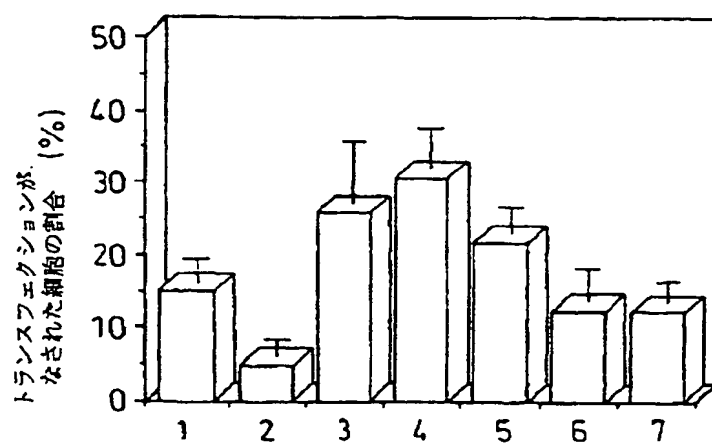


【図2】



【図3】

図 3



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/FR 97/01304

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 6 A61K9/127 A61K48/00 C12N15/88		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 6 A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	S. AKHTAR ET AL.: "interactions of antisense DNA oligonucleotide analogs with phospholipid membranes (liposomes)" NUCLEIC ACIDS RESEARCH, vol. 19, no. 20, 25 October 1991, EYNSHAM, OXFORD (GB), pages 5551-5559, XP002027215 see page 5553, column 1 see page 5554, column 1 ---	1-4, 6-11, 16-21
X	US 4 394 448 A (SZOKA, JR. ET AL.) 19 July 1983 cited in the application	1-4, 6-10, 16-21
Y	see the whole document see column 4, line 50 - line 52 ---	5, 12, 13, 15
-/--		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (see specification) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "Z" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 31 October 1997		Date of mailing of the international search report 11. 11. 97
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patenthaus 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2040, Tx. 31 851 epo nl Fax: (+31-70) 340-3018		Authorized officer Benz, K

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/FR 97/01304

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 95 16437 A (MICRO VESICULAR SYSTEMS, INC.) 22 June 1995 cited in the application see page 3, line 5 - line 25 see page 16 - page 21; examples 4-6 see claims 18,19 ---	1-11,14, 16-21
Y	WO 95 18601 A (CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (C.N.R.S.)) 13 July 1995 cited in the application see the whole document ---	5,15
Y	EP 0 424 688 A (STADLER ET AL.) 2 May 1991 see page 6, line 51 - page 7, line 1 ---	12
Y	DE 40 05 152 A (KAHL) 22 August 1991 see claim 1 ---	13
P,X	WO 97 10851 A (OPPERBAS HOLDING B.V.) 27 March 1997 see page 4, line 5 - page 5, line 26 ---	1-4, 6-10, 16-21
P,X	WO 97 04748 A (ADVANCED THERAPIES, INC.) 13 February 1997 see page 6, line 26 - page 9, line 11 see page 32, line 1 - page 39, line 14 -----	1-4, 6-11,13, 14,16-21

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

information on patent family members

Int. Patent Application No.

PCT/FR 97/01304

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 4394448 A	19-07-83	US 4235871 A	25-11-80
		BE 874408 A	23-08-79
		DE 2907303 A	06-09-79
		EP 0004223 A	19-09-79
		FR 2418023 A	21-09-79
		GB 2015464 A,B	12-09-79
		US 4394149 A	19-07-83

WO 9516437 A	22-06-95	AU 680996 B	14-08-97
		AU 1438395 A	03-07-95
		CA 2177695 A	22-06-95
		EP 0734251 A	02-10-96
		US 5665380 A	09-09-97

WO 9518601 A	13-07-95	FR 2714621 A	07-07-95
		CA 2180480 A	13-07-95
		EP 0737063 A	16-10-96

EP 424688 A	02-05-91	US 5286634 A	15-02-94
		DE 69019290 D	14-06-95
		DE 69019290 T	12-10-95

DE 4005152 A	22-08-91	NONE	

WO 9710851 A	27-03-97	AU 6888496 A	09-04-97

WO 9704748 A	13-02-97	AU 6691496 A	26-02-97

フロントページの続き

(51) Int. Cl. ⁷	識別記号	F I	ターコード (参考)
A 6 1 K	39/00 39/395	A 6 1 K 39/395	Y L
A 6 1 P	1/18 19/00 31/12 35/00	A 6 1 P 1/18 19/00 31/12 35/00	
C 1 2 N	5/10 15/09	A 6 1 K 37/24 37/54 C 1 2 N 15/00 5/00	A B
(72) 発明者	ルネ ラヴェルサンヌ フランス国 33600 ベサック 62, アヴ ニュー ドュ バルク デスパールニュ		
(72) 発明者	ジョエル アメデ フランス国 33600 ベサック 10, リュ デ アンシエン エコール		
(72) 発明者	オリビエ フロインド フランス国 33000 ボルドー 48, リュ ブリザール		